

明 細 書

骨形成促進増強剤及びそのスクリーニング方法

5 技術分野

本発明は、T G F - β (transforming growth factor- β) 選択的阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する骨形成促進増強剤、及び、T G F - β 阻害作用を指標とする、骨形成促進増強剤のスクリーニング方法に関する。

10

背景技術

骨形成促進剤は、近年の社会の高齢化に伴い、所望されている医薬の一つであり、現在、臨床においてはB M P (bone morphogenetic protein) 等が用いられている。しかしながら、B M Pの骨形成作用には、なんらかの自己制御機構が働くため十分な治療効果が得られないという問題がある。その原因は明らかではないが、移植部位からのB M Pの速やかな消失や負のフィードバック機構、内因性の阻害物質の存在が疑われている（例えば、非特許文献1～2参照。）。

15

B M Pは、1965年にUristにより異所性の骨形成を誘導する因子として発見された（例えば、非特許文献3参照。）。その後、ヒトB M PのD N Aクローニングが成功し（例えば、非特許文献4参照。）、遺伝子組換え型ヒトB M P (r h B M P)の製造が可能になったことから、より短時間で効率のよい骨欠損の修復を期待して臨床応用されるようになった。B M Pは、T G F - β スーパーファミリーに属する分子の一つであり、軟骨形成、脂肪形成及び骨形成を促進し、間葉系前駆細胞からの筋形成を阻害すること等が知られている（例えば、非特許文献5～7参照。）

20

25

T G F - β は、線維組織の主たる構成細胞である線維芽細胞を始めとする各種細胞の増殖分化を調節し、かつ創傷の治癒に不可欠な細胞外マ

トリックスの産生沈着を調節する作用を有することが知られている。一方、 $TGF-\beta$ の骨に対する作用に関しては不明な点が多く、骨形成に促進的に働くとする報告（例えば、非特許文献8，9参照。）と抑制的に働くとする報告（例えば、非特許文献10，11参照。）がある。

- 5 特許文献1：国際公開第00/61576号パンフレット
特許文献2：国際公開第00/172737号パンフレット
特許文献3：国際公開第00/162756号パンフレット
特許文献4：国際公開第02/55077号パンフレット
特許文献5：国際公開第00/240467号パンフレット
10 特許文献6：国際公開第02/40468号パンフレット
特許文献7：国際公開第02/066462号パンフレット
特許文献8：国際公開第02/062794号パンフレット
特許文献9：国際公開第02/062787号パンフレット
特許文献10：国際公開第02/062753号パンフレット
15 特許文献11：国際公開第02/062776号パンフレット
特許文献12：国際公開第02/062793号パンフレット
特許文献13：国際公開第00/240476号パンフレット
非特許文献1：Takase M ら，「Biochem Biophys Res Commun.」（米国），Elsevier Science 発行，1998，244，26-29
20 非特許文献2：Valentin-Opran A ら，「Clin Orthop.」（米国），Lippincott Williams & Wilkins 発行，2002，395，110-120
非特許文献3：Urist MR，「Science」（米国），American Association for the Advancement of Science 発行，1965，150，893
非特許文献4：Wozney JM ら，「Science」（米国），American Association
25 for the Advancement of Science 発行，1988，242，1528-1534
非特許文献5：Katagiri T ら，「J. Cell Biol.」（米国），Rockefeller University Press 発行，1994，127，1755-1766
非特許文献6：Ahrens M ら，「DNA Cell Biol.」（米国），Mary Ann Liebert inc. publishers 発行，1993，12，871-880

非特許文献 7 : Asahina I ら, 「Exp. Cell Res.」 (米国), Elsevier Science 発行, 1996, 222, 38-47

非特許文献 8 : Erlebacher A ら, 「J. Cell. Biol.」 (米国), Rockefeller University Press 発行, 1996, 132, 195-210

5 非特許文献 9 : Alliston T ら, 「EMBO J.」 (英国), Oxford University Press 発行, 2001, 20, 2254-2272

非特許文献 10 : Noda M ら, 「Endocrinology」 (米国), Endocrine Society 発行, 1989, 124, 2991-2994

10 非特許文献 11 : Joyce ME ら, 「J. Cell. Biol.」 (米国), Rockefeller University Press 発行, 1990, 110, 2195-2207

非特許文献 12 : Cordeiro MF, 「Current opinion in Molecular Therapeutics」 (米国), BioMed Central Ltd 発行, 2003, 5, 199-203

15 非特許文献 13 : 学会 「American Association for Cancer Research special conference in Cancer research The TGF-beta superfamily, January 15-19, 2003 La Jolla, CA」、講演要旨集 No.B51

非特許文献 14 : Kahari VM ら, 「J. Clin. Invest.」 (米国), American Society for Clinical Investigation 発行, 1990, 86, 1489-1495

20 非特許文献 15 : Boast S ら, 「J. Biol. Chem.」 (米国), American Society for Biochemistry and Molecular Biology 発行, 1990, 265, 13351-13356

非特許文献 16 : Nakaoka T ら, 「J Clin Invest.」 (米国), American Society for Clinical Investigation 発行, 1987, 100, 2824-2832

非特許文献 17 : Nakaoka T ら, 「J Clin Invest.」 (米国), American Society for Clinical Investigation 発行, 1987, 100, 2824-2832

25 非特許文献 18 : Ebisawa T ら, 「J Cell Sci.」 (英国), the company of biologists Ltd 発行, 1999, 112, 3519-3527

非特許文献 19 : Piek E ら, 「J Cell Sci.」 (英国), the company of biologists Ltd 発行, 1999, 112, 4557-4568

非特許文献 20 : Tada K ら, 「Genes Cells.」 (英国), Blackwell

Synergy 発行, 1999, 4, 731-741

非特許文献 2 1 : Saitoh M ら, 「J Biol Chem.」(米国), American Society for Biochemistry and Molecular Biology 発行, 1996, 271, 2769-2775

5 非特許文献 2 2 : Imamura T ら, 「Nature」(英国), nature publishing group 発行, 1997, 389, 622-626

非特許文献 2 3 : Inman GJ ら, 「Mol Cell.」(米国), American Society for Microbiology 発行, 2002, 10, 283-94

10 非特許文献 2 4 : Fujii M ら, 「Mol Biol Cell.」(米国), American Society for Cell Biology 発行, 1999, 10, 3801-3813

非特許文献 2 5 : Korchynskyi O ら, 「J Biol Chem.」(米国), American Society for Biochemistry and Molecular Biology 発行, 2002, 277, 4883-4891

15 非特許文献 2 6 : Ishida W ら, 「J Biol Chem.」(米国), American Society for Biochemistry and Molecular Biology 発行, 2000, 275, 6075-6079

非特許文献 2 7 : Kusanagi K ら, 「Mol Biol Cell.」(米国), American Society for Cell Biology 発行, 2000, 11, 555-565

20 非特許文献 2 8 : Locklin RM ら, 「J Bone Miner Res.」(米国), American Society for Bone and Mineral Research 発行, 2001, 16, 2192-2204

非特許文献 2 9 : Gyo Murakami, Tetsuro Watabe, Kunio Takaoka, Kohei Miyazono, and Takeshi Imamura, 「Cooperative Inhibition of BMP Signaling by Smurf1 and Inhibitory Smads.」, MBC in Press, published April 4, 2003 as 10.1091/mbc.E02-07-0441

25 非特許文献 3 0 : Inman GJ ら, 「Mol Pharmacol.」(米国), The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 発行, 2002, 62, 65-74

非特許文献 3 1 : Fujii M ら, 「Mol Biol Cell.」(米国), American Society for Cell Biology 発行, 1999, 10, 3801-3813

発明の開示

本発明の目的は、BMPの骨形成促進剤としての効果を向上させる優れた骨形成促進増強剤を提供することにある。また、新規な骨形成促進増強剤の探索を行うためのスクリーニング方法を提供することにある。

- 5 本発明者らは骨形成について鋭意検討したところ、TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物が、BMPの骨形成促進作用を増強することを見出し、本発明を完成した。

本発明としては、例えば、以下のものを挙げることができる。

- 10 (1) BMPを有効成分として含有する骨形成促進剤と同時投与又は逐次投与されるものであって、TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する骨形成促進増強剤、

- 15 (2) TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物が4-(4-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル-5-ピリジン-2-イル-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミド(以下、化合物Aという。)である、前記(1)記載の骨形成促進増強剤、

- (3) TGF- β 阻害作用を指標とする、骨形成促進増強剤のスクリーニング方法、

- (4) TGF- β 阻害作用及びBMP阻害作用を指標とする、骨形成促進増強剤のスクリーニング方法。

- 20 以下に本発明を詳述する。

- 本発明において「TGF- β 選択的阻害作用」とは、TGF- β 刺激に基づくシグナル伝達を選択的に阻害することをいう。ここで「選択的」とは、BMP刺激に基づくシグナル伝達系よりも優位にTGF- β 刺激に基づくシグナル伝達を阻害することをいう。該阻害作用の選択性は、
25 用いる実験系、条件、等によって異なるが、3倍以上であることが好ましく、5倍以上であることがより好ましく、10倍以上であることが更に好ましい。

より具体的には、BMPシグナル伝達に関わるタイプIレセプター、タイプIレセプター(ALK2/3/6)に対する阻害作用、又は、S

ma d 1 / 5 / 8 のリン酸化抑制作用に比べて、T G F - β シグナル伝達に関わるタイプ I レセプター、タイプ I レセプター (A L K 5) に対する阻害作用、又は、S m a d 2 / 3 に対するリン酸化抑制作用の方が優位であることをいう。

- 5 T G F - β と B M P は共に T G F - β スーパーファミリーに属し、そのシグナル伝達機構も近似する。本発明において、T G F - β 選択的阻害作用を有する化合物を含有する骨形成促進増強剤は、B M P 刺激等に基づく骨形成促進作用を増強することによって薬効を示すものである。従って、T G F - β 阻害作用も有しているが、同等の B M P 阻害作用も
- 10 有している化合物・薬剤は、本発明の目的を達成し得ない。

- 本発明において「T G F - β 選択的阻害作用を有する化合物」としては、該作用を有していれば、いかなる化学構造の化合物も本発明に含まれる。例えば、化合物 A を含む特許文献 1 記載の化合物は A L K 5 を選択的に阻害する作用を有することが知られている。他に、トリアリールイミダゾール誘導体（例えば、特許文献 2 参照。）、ピリジニルイミダゾール誘導体（例えば、特許文献 3 参照。）、イミダゾールサイクリックアセタール誘導体（例えば、特許文献 4 参照。）、ベンズイミダゾール誘導体（例えば、特許文献 5 参照。）、ジアリールイミダゾール誘導体（例えば、特許文献 6 参照。）、ピラゾール誘導体（例えば、特許文献 7 ~ 9 参
- 15 照。）、チアゾール誘導体（例えば、特許文献 10 ~ 12 参照。）、トリアゾール誘導体（例えば、特許文献 13 参照。）、抗 T G F - β 中和抗体（例えば、非特許文献 12 参照。）を挙げることができる。更に、学会発表された化合物（3 - （ピリジン - 2 - イル） - 4 - （7 - エトキシキノリン - 4 - イル）ピラゾール、3 - （2 - プロピルピリジン - 6 - イル） - 4 - （キノリン - 4 - イル）ピラゾール、3 - （2 - メチルピリジン - 6 - イル） - 4 - （7 - エトキシキノリン - 4 - イル）ピラゾール、3 - （ピリジン - 2 - イル） - 4 - （キノリン - 4 - イル）ピラゾール、3 - （2 - メチルピリジン - 6 - イル） - 4 - （6 - トリフルオロメトキシキノリン - 4 - イル）ピラゾール、3 - （2 - メチルピリジン - 6
- 20 25

ーイル) - 4 - (6 - クロロキノリン - 4 - イル) ピラゾール、3 - (2
 - メチルピリジン - 6 - イル) - 4 - (7 - クロロキノリン - 4 - イル)
 ピラゾール、3 - (3 - エトキシフェニル) - 4 - (7 - エトキシキノ
 リン - 4 - イル) ピラゾール、5 - ヒドロキシメチル - 3 - (ピリジン
 5 - 2 - イル) - 4 - (キノリン - 4 - イル) ピラゾール、5 - (2 - フ
 エネチル) - 3 - (ピリジン - 2 - イル) - 4 - (キノリン - 4 - イル)
 ピラゾール、3 - (3 - トリフルオロメチルフェニル) - 4 - (キノリ
 ン - 4 - イル) ピラゾール、3 - (3 - ブロモフェニル) - 4 - (7 -
 メチルキノリン - 4 - イル) ピラゾール、3 - (2 - メチルピリジン -
 10 - 6 - イル) - 4 - (4 - ヒドロキシフェニル) ピラゾール、5 - メチル
 - 3 - (2 - メチルピリジン - 6 - イル) - 4 - (4 - フルオロフェニ
 ル) ピラゾール、3 - (2 - エチルピリジン - 6 - イル) - 4 - (4 -
 フルオロフェニル) ピラゾール、3 - (2 - メチルピリジン - 6 - イル)
 15 - 4 - (4 - フルオロフェニル) ピラゾール、3 - (2 - メチルピリジ
 ン - 6 - イル) - 4 - (2, 4 - ジクロロフェニル) ピラゾール、3 -
 (2 - メチルピリジン - 6 - イル) - 4 - (3, 4 - ジフルオロフェニ
 ル) ピラゾール、3 - (ピリジン - 2 - イル) - 4 - (4 - フルオロフ
 ェニル) ピラゾール) (例えば、非特許文献 1 3 参照。) も挙げられる。

本発明において「BMP」とは、BMPの種々のサブタイプ、及び、
 20 それらの遺伝子組換えタンパク質を含む、BMPファミリーのタンパク
 質をいう。例えば、BMP - 2 / 3 / 4 / 5 / 6 / 7 / 8、GDF (増殖
 分化因子: growth-differentiation factor) - 5 / 6 / 7 及びそれらの
 遺伝子組換えタンパク質等を例として挙げる事ができる。

本発明において「骨形成促進剤」とは、骨芽細胞の分化・成熟等を促
 25 進し、骨細胞の形成を促進する薬剤をいい、例えば、rhBMP等のB
 MPを例に挙げる事ができる。また、「骨形成促進増強剤」とは、骨形
 成促進作用を増強する薬剤をいう。骨形成促進増強剤は、①歯周病の治
 療、②偽関節形成の確率が高い脛骨解放骨折、遷延治癒骨折、骨欠損の
 多い骨折、骨粗鬆症に伴う骨折、等の種々の骨折の治療や、③骨腫瘍摘

出後の骨欠損の充填、脊椎固定術、特発性大腿骨頭壊死症など骨壊死部の骨再生、変形性膝関節症に対して行う高位脛骨骨切り術などの骨切り術に伴う骨接合術、顎関節症や咬合不全における骨形成術、頭蓋骨・顔面骨奇形における骨形成術、等の種々の手術に用いる薬剤として用いることができる。

本発明において「TGF- β 阻害作用を指標とする、骨形成促進増強剤のスクリーニング方法」とは、TGF- β シグナル伝達に関わるタイプ I レセプター、タイプ I レセプター (ALK5) に対する阻害作用を調べる試験や Smad2/3 のリン酸化阻害作用を調べる試験等、公知の方法は全て本発明にかかるスクリーニング方法に用いることができる。例えば、 $[^3\text{H}]$ プロリンの細胞内取り込み量を指標とした TGF- β 誘発コラーゲン産生を調べる方法 (例えば、非特許文献 14 参照。)、タイプ I プロコラーゲン α_2 鎖遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を連結させたキメラプラスミドを導入した細胞株を用いたレポーターアッセイ (例えば、非特許文献 15 参照。)、TGF- β の細胞増殖抑制作用を Mv1Lu 細胞でみる $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みアッセイ (例えば、非特許文献 16 参照。)、TGF- β による細胞増殖抑制を調べる方法 (例えば、非特許文献 17、18 参照。)、NmuMG 細胞の分化を調べる方法 (例えば、非特許文献 19 参照。)、TGF- β レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイ (例えば、非特許文献 20 参照。)、標的遺伝子 PAI-1 の発現を調べる方法 (例えば、非特許文献 21 参照。)、クロスリンキング法によるレセプターへの結合を調べる方法 (例えば、非特許文献 22 参照。)、抗リン酸化 Smad2/3 抗体を用いたウエスタンブロッティング (例えば、非特許文献 23 参照。) が知られているが、これらに限定されるものではない。

これらのスクリーニング方法を用いることにより、TGF- β 阻害作用を有する新規骨形成促進増強剤を探索することができる。

さらに、これらのスクリーニング方法と、以下に説明する BMP 阻害作用を指標とするスクリーニング方法と併用することにより、TGF-

β 阻害作用を有し、BMP 阻害作用の少ない、より有用性の高い新規骨形成促進増強剤を探索することができる。

本発明において「BMP 阻害作用を指標とする、骨形成促進増強剤のスクリーニング方法」とは、BMP シグナル伝達に関わるタイプ I レセプター、タイプ I レセプター (ALK 2 / 3 / 6) に対する阻害作用を調べる試験や Smad 1 / 5 / 8 のリン酸化抑制作用を調べる試験等、公知の方法は全て本発明にかかるスクリーニング方法に用いることができる。例えば、間葉系前駆細胞 (C2C12 細胞など) の骨芽細胞への分化のアッセイ (例えば、非特許文献 24 参照。)、BMP のレポーター (1d-1-Luc) を用いたルシフェラーゼアッセイ (例えば、非特許文献 25 参照。)、BMP のレポーター (3GC-Luc) を用いたルシフェラーゼアッセイ (例えば、非特許文献 26 参照。)、BMP のレポーター (GCCG-Luc) を用いたルシフェラーゼアッセイ (例えば、非特許文献 27 参照。)、標的遺伝子 (1d-1 など) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により調べる方法 (例えば、非特許文献 28 参照。)、Xenopus を用いた 2 次軸形成検定 (例えば、非特許文献 29 参照。)、クロスリンキング法によるレセプターへの結合を調べる方法 (例えば、非特許文献 22 参照。)、抗リン酸化 Smad 1 / 5 / 8 抗体を用いたウェスタンブロッティング (例えば、非特許文献 30 参照。) が知られているが、これらに限定されるものではない。

20 本発明にかかるスクリーニング方法の実験手法自体は公知であるが、骨形成促進増強剤の探索のためのスクリーニング方法として利用可能であることは、本発明者らが初めて見出した知見である。

図面の簡単な説明

25 第 1 図は、試験例 1 において、各 C2C12 細胞をアルカリホスファターゼ染色した写真の図である。左列は rh BMP-4 を添加していない群、右列は rh BMP-4 を添加した群である。また、上段は対照群、中段は DMSO を添加した群、下段は化合物 A を添加した群である。

第 2 図は、試験例 1 において、各 C2C12 細胞のアルカリホス

ファターゼ活性をグラフ化した図である。縦軸はアルカリアルカリホスファターゼ活性 (nmol p-NP/min/mg protein) を表す。

第3図は、試験例2において、各ヒト間葉系前駆細胞のアルカリアルカリホスファターゼ活性をグラフ化した図である。縦軸はアルカリアルカリホスファターゼ活性 (nmol p-NP/min/mg protein) を表す。

第4図は、試験例2において、ヒト間葉系前駆細胞を von Kossa 染色した写真の図である。左列は BMP-4 を添加していない群、右列は BMP-4 を添加した群である。また、上段は対照群、中段は DMSO を添加した群、下段は化合物 A を添加した群である。

第5図は、試験例2において、von Kossa 染色したヒト間葉系前駆細胞を NIH image 測定した結果をグラフ化した図である。

第6図は、試験例3において、各 C2C12 細胞のアルカリアルカリホスファターゼ活性をグラフ化した図である。縦軸はアルカリアルカリホスファターゼ活性 (nmol p-NP/min/mg protein) を表す。

第7図は、試験例4において、各 C2C12 細胞をアルカリホスファターゼ染色した写真の図である。最左列は FBS を 10% 添加し、かつ、BMP-4 を添加していない群、左から 2、3、4、5 列はそれぞれ FBS を 2.5、5、10、20% 添加し、かつ、BMP-4 を添加した群である。また、上段は対照群、中段は DMSO を添加した群、下段は化合物 A を添加した群である。

第8図は、試験例4において、各 C2C12 細胞のアルカリアルカリホスファターゼ活性をグラフ化した図である。縦軸はアルカリアルカリホスファターゼ活性 (nmol p-NP/min/mg protein) を表す。

25 発明を実施するための最良の形態

TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物の中で酸性基を有するものは、遊離の酸のまま薬剤として用いることができるが、公知の方法により医薬上許容しうる塩の形にして用いることもできる。このような塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩、及び、カ

ルシウムなどのアルカリ土類金属塩などを挙げることができる。

TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物の中で塩基性基を有するものは、遊離の塩基のまま薬剤として用いることができるが、公知の方法により医薬上許容しうる塩の形にして用いることもできる。このような
5 塩としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、燐酸などの鉱酸の塩、酢酸、クエン酸、酒石酸、マレイン酸、コハク酸、フマル酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、メタンスルホン酸などの有機酸の塩を挙げることができる。

TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物は、BMPと同時に投与、
10 あるいは、逐次的に併用することができる。

同時投与の場合、別個の薬剤として同時に投与することもでき、また、一つの製剤中に、TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物又はその医薬上許容しうる塩とBMPとを含有させることもできる。逐次的併用とは、TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物又はその医薬上許容し
15 うる塩とBMPとを、一定の時間間隔をあけて投与することを意味する。本発明においてはいずれを先に投与してもよい。一定の時間間隔は、用いる骨形成促進剤や骨形成促進増強剤の動態等を考慮して決定することができる。

本発明に係る薬物は、そのまま又は医薬上許容される無毒性かつ不活性の担体中に、例えば 0.01~99.5%、好ましくは 0.5~90%を含有する
20 医薬組成物として、人を含む動物に投与される。

担体としては、固形、半固形又は液状の希釈剤、充填剤及びその他の処方用の助剤一種以上が用いられる。薬物は投与単位形態で投与することが望ましい。また、薬物は、静脈内投与、経口投与、組織内投与、局
25 所投与（経皮投与等）又は経直腸的に投与することができるが、これらに限定されるものではない。これらの投与方法に適した剤型で投与されるのはもちろんである。

骨形成促進増強剤としての用量は、疾患・傷害の性質と程度、年齢、体重などの患者の状態、投与経路などを考慮した上で設定することが望

ましいが、通常は、成人に対して本発明に係る薬物の有効成分量として、1日あたり、0.1～1000mg／ヒトの範囲、好ましくは1～500mg／ヒトの範囲が一般的である。

場合によっては、これ以下で足りるし、また逆にこれ以上の用量を必要とすることもある。また1日2～4回に分割して投与することもできる。

経口投与は固形又は液状の用量単位、例えば、末剤、散剤、錠剤、糖衣剤、カプセル剤、顆粒剤、懸濁剤、液剤、シロップ剤、ドロップ剤、舌下錠その他の剤型によって行うことができる。

10 末剤は薬物を適当な細かさにするにより製造される。散剤は薬物を適当な細かさとし、ついで同様に細かくした医薬用担体、例えば澱粉、マンニトールのような可食性炭水化物その他と混合することにより製造される。必要に応じ風味剤、保存剤、分散剤、着色剤、香料その他のものを混じてもよい。

15 カプセル剤は、まず上述のようにして粉末状となった末剤や散剤又は錠剤の項で述べるように顆粒化したものを、例えばゼラチンカプセルのようなカプセル外皮の中へ充填することにより製造される。滑沢剤や流動化剤、例えばコロイド状のシリカ、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、固形のポリエチレングリコールのようなものを粉末状態のものに混合し、然るのちに充填操作を行うこともできる。

20 崩壊剤や可溶化剤、例えばカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムを添加すれば、カプセル剤が摂取されたときの医薬の有効性を改善することができる。

25 また、薬物の微粉末を植物油、ポリエチレングリコール、グリセリン、界面活性剤中に懸濁分散し、これをゼラチンシートで包んで軟カプセル剤とすることができる。錠剤は賦形剤を加えて粉末混合物を作り、顆粒化もしくはスラグ化し、ついで崩壊剤又は滑沢剤を加えたのち打錠する

ことにより製造される。粉末混合物は、適当に粉末化された薬物を上述の希釈剤やベースと混合し、必要に応じ結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなど）、溶解遅延化剤（例えば、パラフィンなど）、再吸収剤（例えば、四級塩）や吸着剤（例えばベントナイト、カオリン、リン酸ジカルシウムなど）をも併用してもよい。粉末混合物は、まず結合剤、例えばシロップ、澱粉糊、アラビアゴム、セルロース溶液又は高分子物質溶液で湿らせ、攪拌混合し、これを乾燥、粉碎して顆粒とすることができる。

5 このように粉末を顆粒化するかわりに、まず打錠機にかけたのち、得られる不完全な形態のスラグを破碎して顆粒にすることも可能である。

このようにして作られる顆粒は、滑沢剤としてステアリン酸、ステアリン酸塩、タルク、ミネラルオイルその他を添加することにより、互いに付着することを防ぐことができる。このように滑沢化された混合物を

15 ついで打錠する。こうして製造した素錠にフィルムコーティングや糖衣を施すことができる。

また薬物は、上述のように顆粒化やスラグ化の工程を経ることなく、流動性の不活性担体と混合したのちに直接打錠してもよい。シェラックの密閉被膜からなる透明又は半透明の保護被覆、糖や高分子材料の被覆、及び、ワックスよりなる磨上被覆の如きも用いうる。

20

他の経口投与剤型、例えば溶液、シロップ、エリキシルなどもまたその一定量が薬物の一定量を含むように用量単位形態にすることができる。シロップは、薬物を適当な香味水溶液に溶解して製造され、またエリキシルは非毒性のアルコール性担体を用いることにより製造される。

25 懸濁剤は、薬物を非毒性担体中に分散させることにより処方される。可溶化剤や乳化剤（例えば、エトキシ化されたイソステアリルアルコール類、ポリオキシエチレンソルビトールエステル類）、保存剤、風味賦与剤（例えば、ペパメント油、サッカリン）その他もまた必要に応じ添加することができる。

必要とあらば、経口投与のための用量単位処方マイクロカプセル化してもよい。該処方はまた被覆をしたり、高分子・ワックス等中にうめこんだりすることにより作用時間の延長や持続放出をもたらすこともできる。

- 5 組織内投与は、皮下・筋肉又は静脈内注射用としたところの液状用量単位形態、例えば溶液や懸濁剤の形態を用いることによって行うことができる。これらのものは、薬物の一定量を、注射の目的に適合する非毒性の液状担体、例えば水性や油性の媒体に懸濁し又は溶解し、ついで該懸濁液又は溶液を滅菌することにより製造される。注射液を等張にするために非毒性の塩や塩溶液を添加してもよい。更に、安定剤、保存剤、
10 乳化剤のようなものを併用することもできる。

また、BMPは、生分解性マトリックスや多孔性粒子等の担体に吸着させた製剤として、治療部位へ移植して使用されているが、本発明に係る薬物を同一又は別の担体に吸着させて用いることもできる。

- 15 直腸投与は、薬物を低融点の水に可溶又は不溶の固体、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、半合成の油脂（例えば、ウイテプゾール、登録商標）、高級エステル類（例えばパルミチン酸ミリスチルエステル）及びそれらの混合物に溶解又は懸濁させて製造した坐剤等を用いることによって行うことができる。

- 20 以下に試験例及び製剤例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

試験例 1

化合物 A を用いた骨形成促進増強作用 (1)

- 25 C2C12 細胞 (American Type Culture Collection) を 5% のウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (対照)、0.01% ジメチルスルホキシド (DMSO) を加えた同培地 (DMSO (0.01%)) 及び $1 \mu\text{M}$ の化合物 A を加えた同培地 (化合物 A ($1 \mu\text{M}$)) で、50ng/ml の遺伝子組換えヒト BMP-4 (rhBMP-4) 添加及び無添加で培養した。それぞれの細胞を 9 日間培養した後、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色キ

ット # 85-3R (Sigma 社) により染色し、骨分化の進行度合いを調べた。
ALP 活性の定量的解析は、Fujii らの方法 (例えば、非特許文献 3 1 参照。) に従い、Sigma Fast p-nitrophenyl phosphate tablet set を用いて行った。各抽出物のタンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準物質として DC protein assay (Bio-Rad) により測定した。

その結果を第 1 図及び第 2 図に示す。

第 1 図に示す通り、化合物 A は、単独では C2C12 細胞の骨分化促進作用は認められないが、r h B M P - 4 (50ng/ml) で誘導した C2C12 細胞においては、r h B M P - 4 刺激による骨分化促進作用を増強した。

10 試験例 2

化合物 A を用いた骨形成促進増強作用 (2)

ヒト間葉系前駆細胞 (h MSCs) (Poietics) を ITS supplement (Sigma) を含む無血清培地 (対照)、0.01%DMSO を加えた同培地 (DMSO (0.01%)) 及び 1 μ M の化合物 A を加えた同培地 (化合物 A (1 μ M)) で、50ng/ml の r h B M P - 4 添加あるいは無添加で培養した。ALP 活性の定量的解析は、試験例 1 と同様の方法で行った。カルシウムの貯留は、von Kossa 法により可視化し測定した。即ち、それぞれの細胞を 3%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で固定化し、P B S および蒸留水で洗浄した。固定化された細胞は、光照射しながら 60 分間 2.5%硝酸銀を作用させた後、洗浄し 0.5%ハイドロキノンで 2 分間展開した。過剰の銀は 5%チオ硫酸ナトリウム溶液で洗い流した。

その結果を第 3 図、第 4 図及び第 5 図に示す。

第 3 図、第 4 図及び第 5 図に示す通り、r h B M P - 4 により誘導された ALP 活性及びカルシウム貯留の上昇が、化合物 A の添加により更に亢進された。このことから、化合物 A が r h B M P - 4 刺激による骨分化促進作用を増強することは明らかである。

上記試験例 1 及び 2 における骨分化促進増強作用が、化合物 A 独自の作用に基づくものではなく、T G F - β を選択的に阻害することにより生じる作用であることを明らかにすべく、以下の試験例 3 を行った。

試験例 3

抗 T G F - β 中和抗体を用いた骨形成促進増強作用

- 50ng/ml の r h B M P - 4 と 10 μ g/ml の抗 T G F - β 1/2/3 中和抗体を添加した培地、50ng/ml の r h B M P - 4 を添加した培地、10 μ g/ml の抗 T G F - β 1/2/3 中和抗体を添加した培地および無添加の培地で C2C12 細胞を 9 日間培養した。それぞれの細胞について試験例 1 と同様の方法で ALP 活性を測定した。

その結果を第 6 図に示す。

- 第 6 図に示す通り、抗 T G F - β 中和抗体 (Ab) は、試験例 1 と同様、r h B M P - 4 刺激による骨分化促進作用を増強した。以上の結果より、T G F - β を阻害することにより B M P の骨分化促進作用が増強されることは明らかである。

試験例 4

骨形成促進増強作用における血清濃度の影響

- C2C12 細胞を F B S 濃度 2.5%、5%、10%、20% に調製した培地中に、1 μ M の化合物 A と 50ng/ml の r h B M P - 4 を添加し 9 日間培養した。対照として化合物 A の代わりに 0.01%DMSO あるいは無添加で培養した。それぞれの細胞より試験例 1 と同様の方法で ALP 活性を測定した。

- その結果を第 7 図及び第 8 図に示す。

- 第 7 図及び第 8 図に示す通り、F B S 濃度が高くなるにつれ、化合物 A による骨分化促進増強作用が減弱された。この現象は、試験例 1 及び 2 で得られた知見より、F B S の濃度即ち血清中の T G F - β の濃度の上昇に伴い、骨分化促進増強作用が減弱されたと考えられる。このことから、化合物 A が、T G F - β のシグナル伝達を選択的に阻害することにより、B M P による骨形成促進作用を増強することは明らかである。

製剤例 1

錠剤 (内服錠)

処方 1 錠 80mg 中

	化合物 A	5.0mg
	トウモロコシ澱粉	46.6mg
	結晶セルロース	24.0mg
	メチルセルロース	4.0mg
5	ステアリン酸マグネシウム	0.4mg

この割合の混合末を通常の方法により打錠成形し内服錠とする。

製剤例 2

錠剤（内服錠）

処方 1 錠 80mg 中

10	化合物 A	5.0mg
	トウモロコシ澱粉	46.6mg
	結晶セルロース	24.0mg
	メチルセルロース	4.0mg
	ステアリン酸マグネシウム	0.4mg

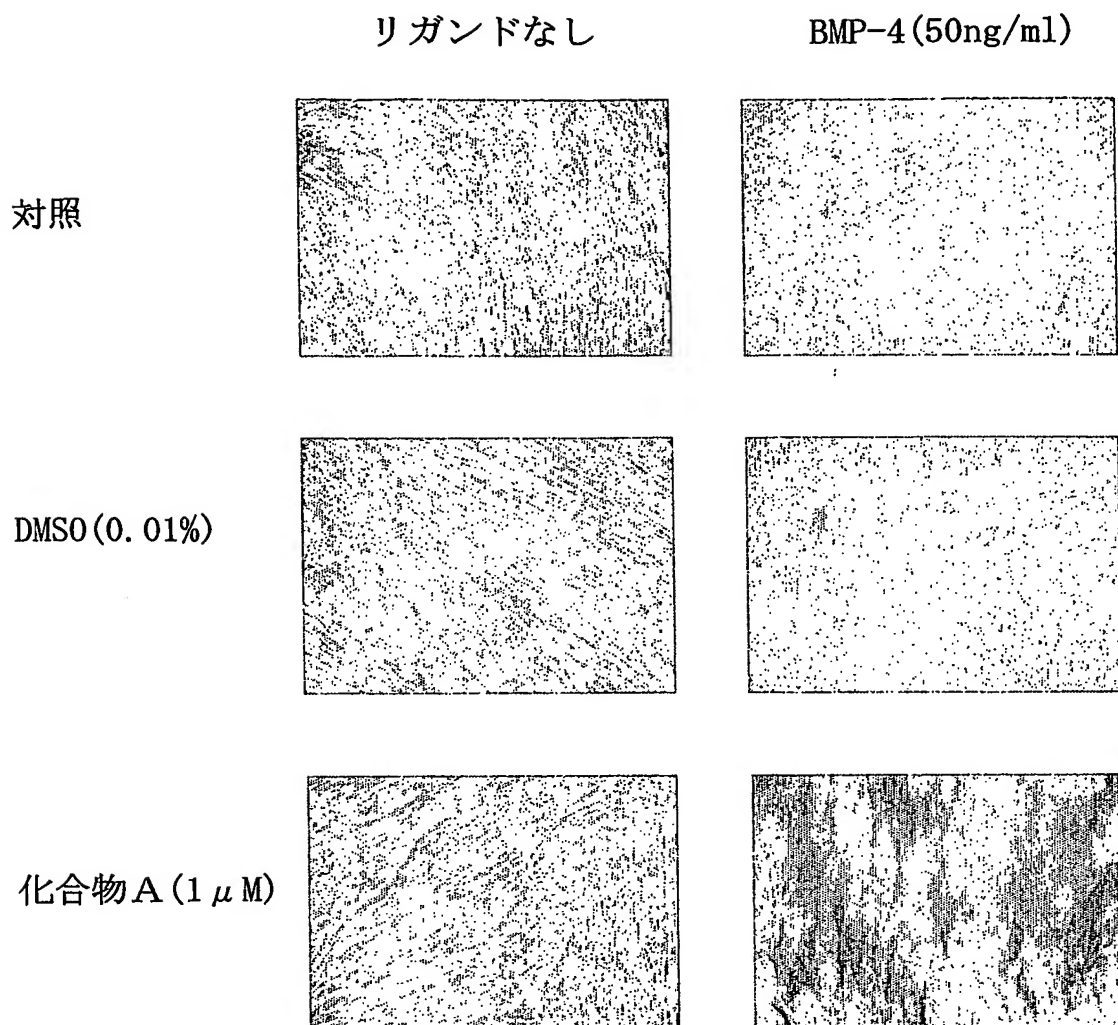
15 この割合の混合末を通常の方法により打錠成形し内服錠とする。

産業上の利用可能性

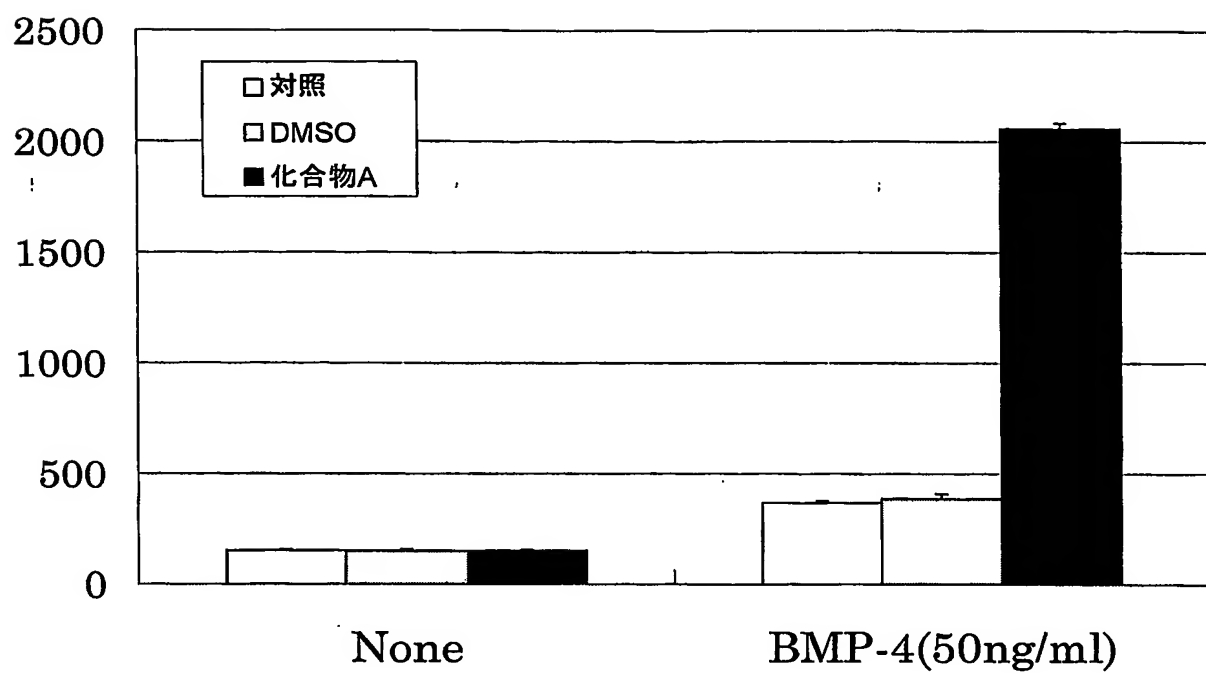
本発明にかかる骨形成促進増強剤は、BMPを含有する骨形成促進剤と同時投与、又は、併用投与することにより、骨分化促進作用を増強することから、臨床においてBMPを含有する骨形成促進剤を使用する場合
20 のより良好な有用性が期待できる。また、新規な骨形成促進剤のスクリーニング方法を提供することにより、臨床において所望されている医薬の探索において有用である。

請 求 の 範 囲

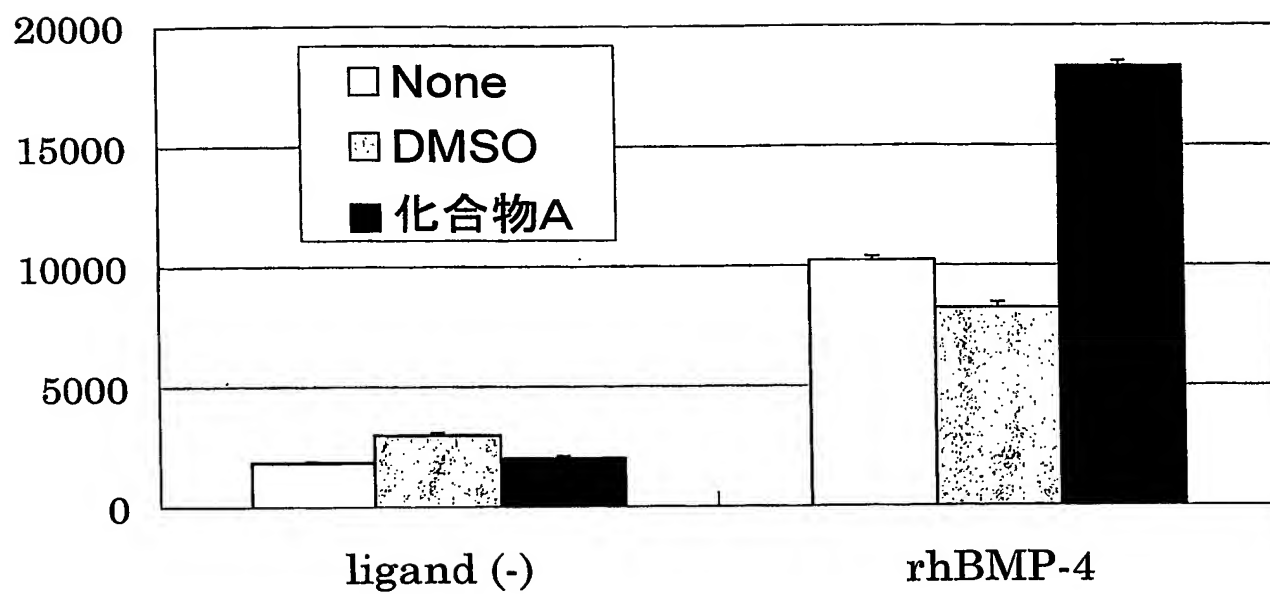
1. BMPを有効成分として含有する骨形成促進剤と同時投与又は逐次投与されるものであって、TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する骨形成促進増強剤。
- 5 2. TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物が 4-(4-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル-5-ピリジン-2-イル-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミドである、請求項1記載の骨形成促進増強剤。
3. TGF- β 阻害作用を指標とする、骨形成促進増強剤のスクリーニング方法。
- 10 4. TGF- β 阻害作用及びBMP阻害作用を指標とする、骨形成促進増強剤のスクリーニング方法。



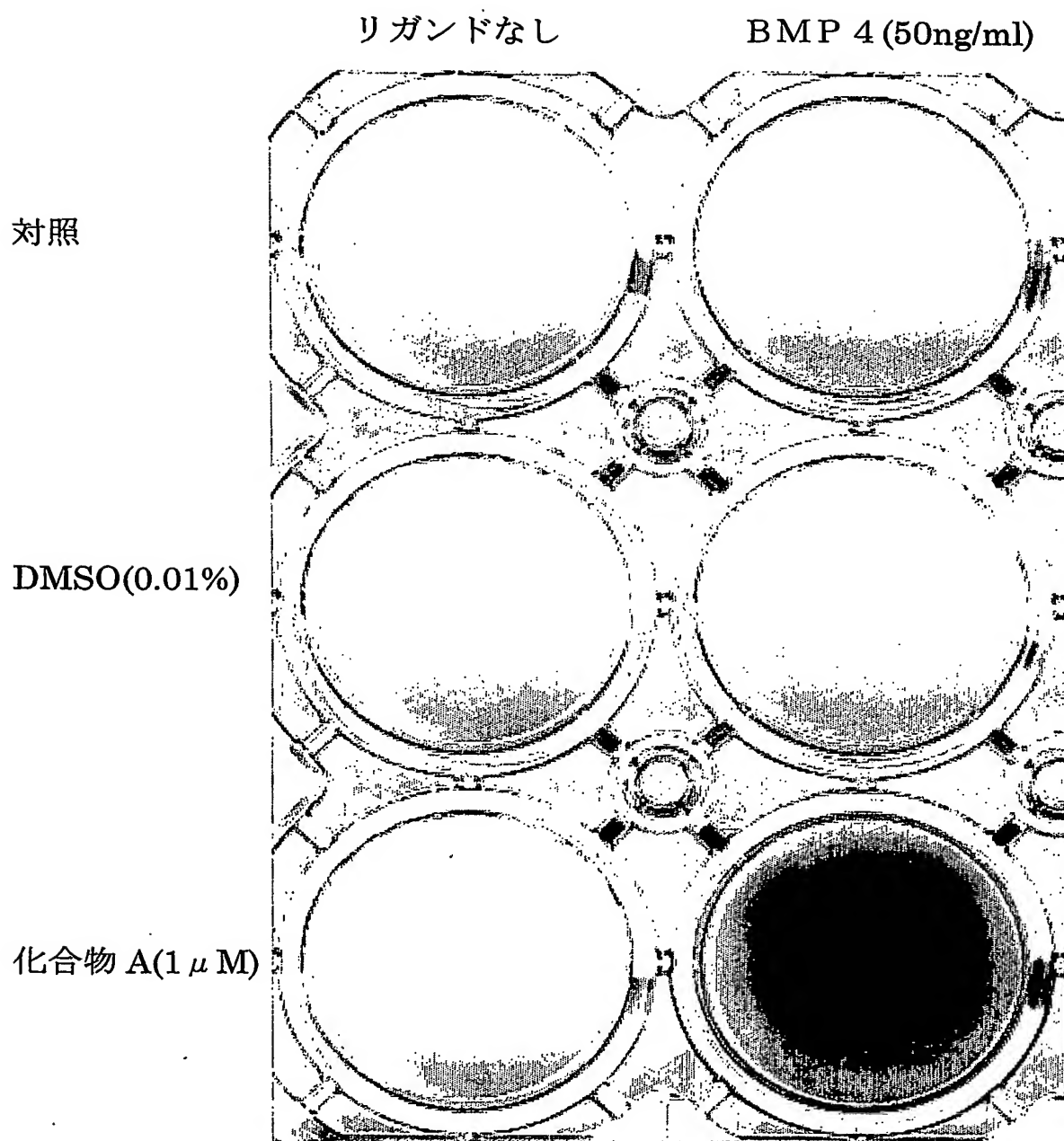
第1図



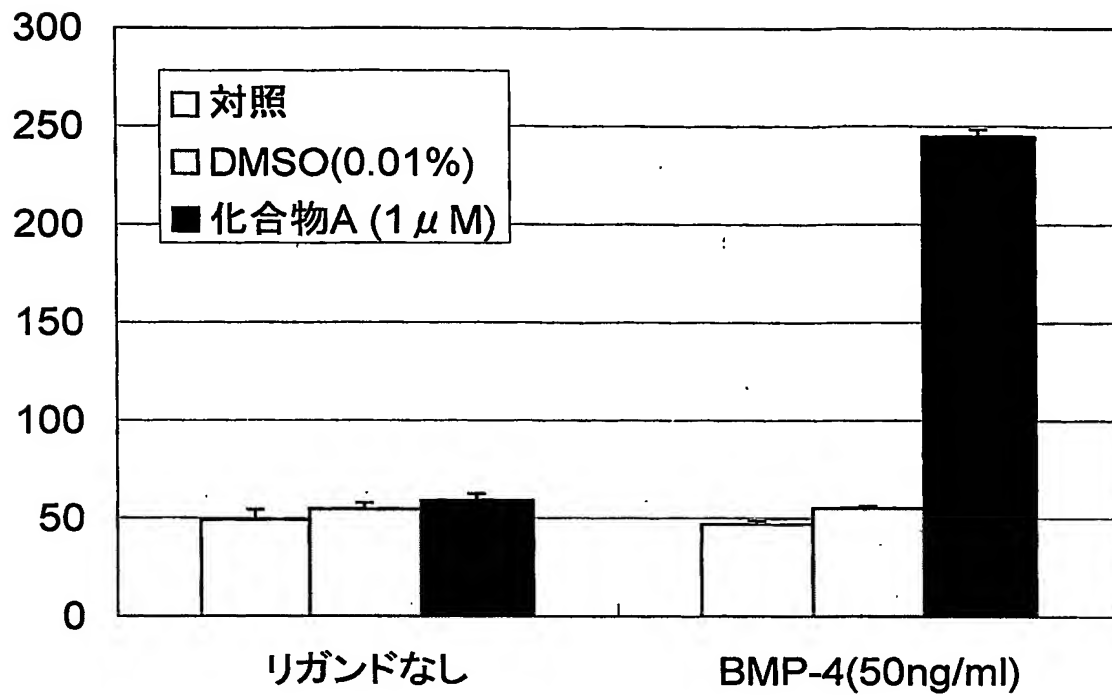
第2図



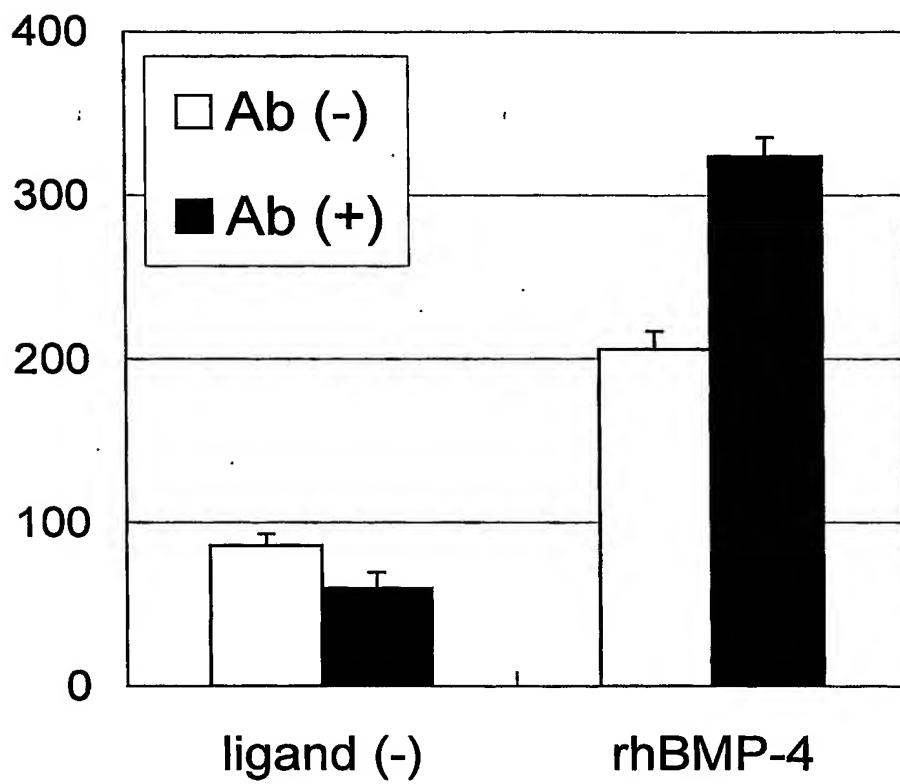
第3図



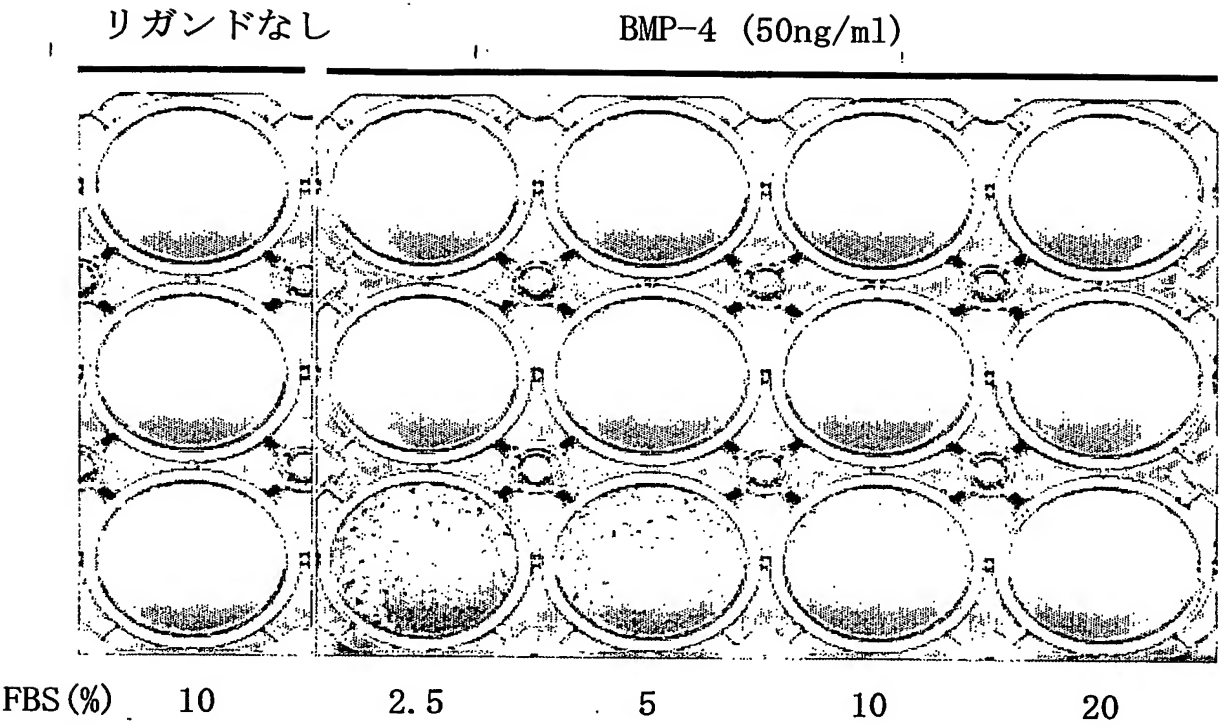
第4図



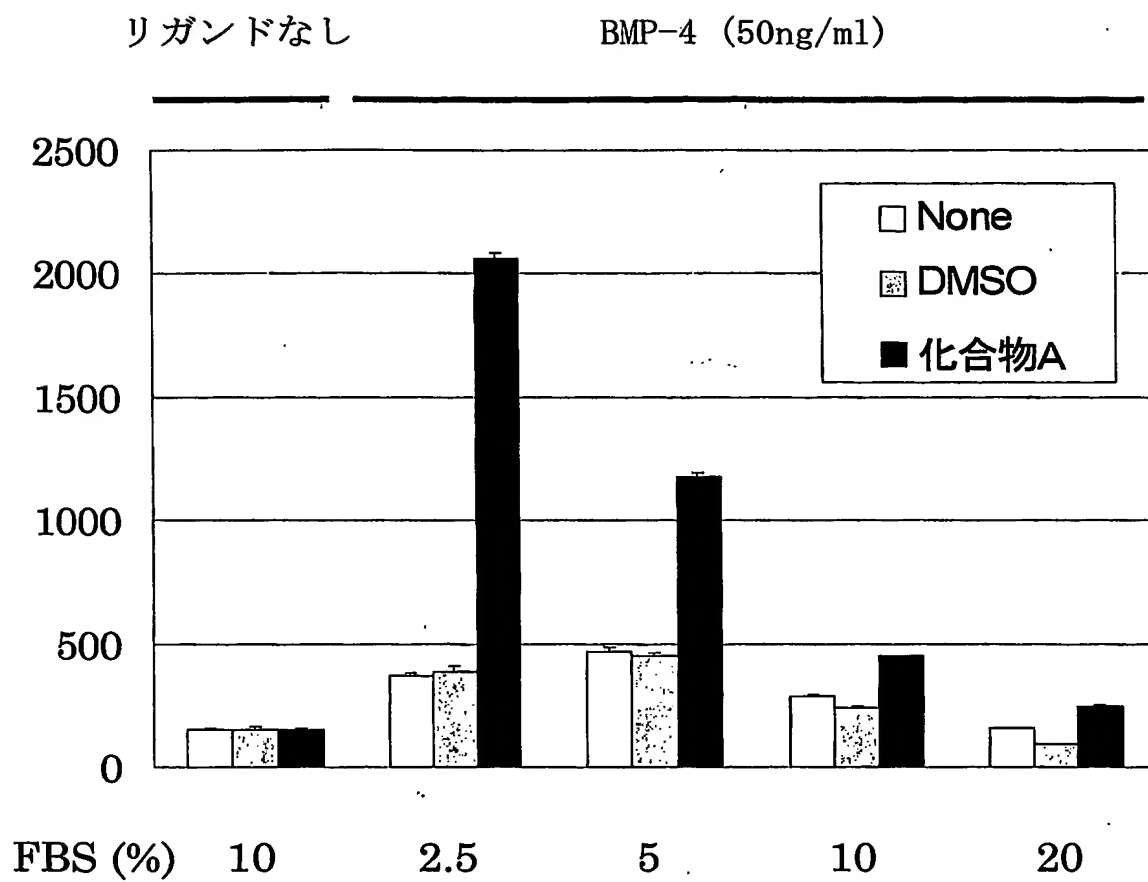
第5図



第 6 図



第7図



第8図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K45/00, A61K38/18, A61K31/4439, A61P19/08, G01N33/15, G01N33/50 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K45/00, A61K38/18, A61K31/4439, A61P19/08, G01N33/15, G01N33/50 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), EMBASE (STN), CAOLD (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-541253 A (SmithKline Beecham Corp.), 03 December, 2002 (03.12.02), Full text & WO 2000/61576 A1 & EP 1169317 A1 & US 6465493 B1	1, 2
Y	WO 2002-22871 A2 (DECODE GENETICS EHF), 21 March, 2002 (21.03.02), Full text & JP 2004-508835 A & EP 1347992 A2 & US 6630304 B1	1, 2
Y	Kunio TAKAOKA, Tominaga SHIMIZU, "BMP ni yoru Hone Saisei to Kotsu Soshosho", Igaku no Ayumi, 2001, Vol.198, No.9, pages 625 to 629; page 625, lower left column	1, 2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 October, 2004 (01.10.04)		Date of mailing of the international search report 19 October, 2004 (19.10.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008248

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SPINELLA-JAEGLE, S. et al., Opposite effects of bone morphogenetic protein -2 and transforming growth factor- β 1 on osteoblast differentiation, Bone, 2001, Vol.29, No.4, pages 323 to 330, full text	4 1,2
X Y	Shingo MAEDA, Kenji IMAMURA, Kohei MIYAZONO, "TGF- β /BMP Signal to Kotsuga Saibo Bunka", Experimental Medicine, 2002, Vol.20, No.17 (Zokan), pages 101 to 106; page 105, left column, lines 15 to 17	4 1,2
Y	INMAN, Gareth J. et al., SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7, Molecular Pharmacology, 2002, Vol.62, No.1, pages 65 to 74, full text	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008248

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The special technical feature common to the inventions according to claims 1, 2 and 4 resides in osteogenesis-promotion enhancers containing a compound having a selective TGF- β inhibitory effect as the active ingredient.

On the other hand, the invention according to claim 3 relates to a method of screening an osteogenesis-promotion enhancer with the use of the TGF- β inhibitory effect as an indication. Since it is considered that the TGF- β inhibitory effect differs from the selective TGF- β inhibitory effect, it cannot be recognized that the inventions according to claims 1, 2 and 4 and the invention according to claim 3 have a special technical feature in common.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1, 2 and 4.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008248

<Subject of search>

Although claim 1 involves any osteogenesis-promotion enhancers containing a compound having a desired property "having a selective TGF- β inhibitory effect" as the active ingredient, only small part of the claimed compounds are disclosed in the meaning within PCT Article 5. Thus, it is considered that claim 1 is not supported by the disclosure in the description in the meaning within PCT Article 6.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the compounds having the property as "a compound having a selective TGF- β inhibitory effect" cannot be specified. Thus, claim 1 does not comply with the requirement of clearness in the meaning within PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made on the relationship between selective TGF- β inhibition and the effect of enhancing osteogenesis promotion and an osteogenesis-promotion enhancer containing the compound specified in claim 2 as the active ingredient that is specifically presented in the description. Complete search was made on claims 2 and 4.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl ¹	A 61K 45/00,	A 61K 38/18,
	A 61K 31/4439,	A 61P 19/08,
	G 01N 33/15,	G 01N 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl ¹	A 61K 45/00,	A 61K 38/18,
	A 61K 31/4439,	A 61P 19/08,
	G 01N 33/15,	G 01N 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN),	EMBASE (STN),
CAOLD (STN),	BIOSIS (STN),
MEDLINE (STN),	REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-541253 A (スミスクライン・ビーチャム・コーポレイション), 2002. 12. 3, 全文 & WO 2000/61576 A1 & EP 1169317 A1 & US 6465493 B1	1, 2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 10. 2004

国際調査報告の発送日

19.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新 留 素 子

4 P

3 4 3 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2002/22871 A2 (DECODE GENETICS EHF) 2002.3.21, 全文 & JP 2004-508835 A & EP 1347992 A2 & US 6630304 B1	1, 2
Y	高岡邦夫 清水富永 BMPによる骨再生と骨粗鬆症, 医学のあゆみ, 2001, Vol.198, No.9, p.625-629, 第625頁 左下欄	1, 2
X Y	SPINELLA-JAEGLE, S. et al., Opposite effects of bone morphogenetic protein -2 and transforming growth factor- β 1 on osteoblast differentiation, Bone, 2001, Vol.29, No.4, p.323-330, 全文	4 1, 2
X Y	前田真吾、今村健志、宮園浩平, TGF- β /BMPシグナルと骨芽細胞分化, 実験医学, 2002, Vol.20, No.17 (増刊), p.101-106, 第105頁 左欄第15-17行	4 1, 2
Y	INMAN, Gareth J. et al., SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7, Molecular Pharmacology, 2002, Vol.62, No.1, p.65-74, 全文	1, 2

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1、2、4に係る発明の共通の特別な技術的特徴は、TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する骨形成促進増強剤である。
これに対し、請求の範囲3に係る発明は、TGF- β 阻害作用を指標とする、骨形成促進増強剤のスクリーニング方法であり、TGF- β 阻害作用は、TGF- β 選択的阻害作用とは異なると認められるので、請求の範囲1、2、4に係る発明と請求の範囲3に係る発明は、共通の特別な技術的特徴を有するものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲1、2、4

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1は、「TGF- β 選択的阻害作用を有する」という所望の特性を有するあらゆる化合物を有効成分として含有する骨形成促進増強剤を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物の極一部に過ぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「TGF- β 選択的阻害作用を有する化合物」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、TGF- β 選択的阻害と骨形成促進増強作用について、及び、明細書に具体的に記載された、請求の範囲2に特定されている化合物を有効成分とする骨形成促進増強剤について行った。また、請求の範囲2, 4については完全な調査を行った。